

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 64-015649

(43)Date of publication of application : 19.01.1989

(51)Int.CI.

G01N 27/46

G01N 27/30

(21)Application number : 62-171967

(71)Applicant : DAIKIN IND LTD

(22)Date of filing : 09.07.1987

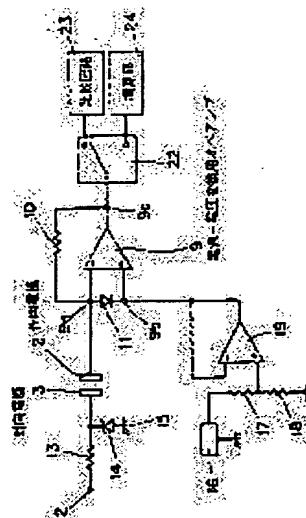
(72)Inventor : ICHIYAMA MASATSUGU

(54) APPARATUS FOR DETECTING ACTIVITY LOWERING STATE OF IMMOBILIZED ENZYME MEMBRANE IN BIOSENSOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To detect the activity lowering state of an immobilized enzyme membrane, in a biosensor wherein a physiologically active substance is immobilized in the surfaces of substrate electrodes, by providing a current detecting means for detecting the supply current between the substrate electrodes at the time of non-measurement.

CONSTITUTION: A current-voltage converting resistor 10 is connected to a current-voltage converting operational amplifier 9 and a diode 11 is connected between a reversal input terminal 9a and a non-reversal input terminal 9b. The reversal input terminal 9a is connected to an acting electrode 2 and an opposed electrode 3 is connected to an inverse bias supply terminal 12 through a resistor 13. The output from the constant voltage source 6 is divided to be connected to the non-reversal input terminal to constitute a bias supply circuit. By connecting an output terminal 9c to a concn. measuring operation part 24 and an active state discriminating comparing circuit 23 through a change-over switch 22, an active state can be discriminated from the current flowing between forwardly biased electrodes by the comparing circuit.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報 (A) 昭64-15649

⑬ Int.Cl.⁴G 01 N 27/46
27/30

識別記号

厅内整理番号
M-7363-2G
J-7363-2G

⑭ 公開 昭和64年(1989)1月19日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 バイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置

⑯ 特願 昭62-171967

⑰ 出願 昭62(1987)7月9日

⑱ 発明者 市山 雅嗣 滋賀県草津市岡本町字大谷1000番地の2 ダイキン工業株式会社滋賀製作所内

⑲ 出願人 ダイキン工業株式会社 大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル

⑳ 代理人 弁理士 津川 友士

明細書

1. 発明の名称

バイオセンサにおける
固定化酵素膜活性低下状態検出装置

2. 特許請求の範囲

1. 下地電極の表面に、生理活性物質を固定化した固定化酵素膜を設けることにより、酵素反応の結果に基いて下地電極により電気信号を生成し、生成電気信号に基いて対象物質の測定を行なうバイオセンサにおいて、非測定時における下地電極間の通電電流を検出する電流検出手段と、電流検出手段により検出された通電電流を所定の基準値と比較し、通電電流が基準値よりも小さい状態に対応させて活性低下状態検出信号を生成する処理手段とを具備することを特徴とするバイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置。

2. 電流検出手段が、下地電極間に保存電

圧を印加している状態における通電電流を検出するものである上記特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置。

3. 電流検出手段が、下地電極間にリフレッシュのための逆バイアス電圧を印加している状態における通電電流を検出するものである上記特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置。

4. 電流検出手段が、下地電極間にリフレッシュのための逆バイアス電圧を印加している状態における通電電流の最大値を検出するものである上記特許請求の範囲第3項記載のバイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置。

5. 電流検出手段が、下地電極間に保存電圧を印加している状態における通電電流、および下地電極間にリフレッシュのための逆バイアス電圧を印加している状態に

おける通電電流の最大値を検出するものである上記特許請求の範囲第1項記載のバイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置。

3. 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

この発明はバイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置に関し、さらに詳細にいえば、生理活性物質を固定化した固定化活性膜を下地電極の上に設け、活性反応の結果に基いて下地電極において測定対象物質に対応する電気信号を生成するバイオセンサにおいて、乾燥に起因して固定化酵素膜の活性が低下した状態を検出するための装置に関する。

<従来の技術、および発明が解決しようとする問題点>

従来から非常に複雑な有機化合物、蛋白質等を極めて高感度に、かつ選択性的に検知することができるという特質に着目して、下地電極の表面に生理活性物質を固定してなるバイオセンサにより上

することができる。

しかし、上述のように、標準液に対応する仮の濃度測定データと、測定対象物質に対応する濃度測定データとに基いて測定対象物質の真の濃度データを正確に得ることができるためにには、生理活性物質がある程度以上の活性を有している状態でなければならず、したがって、生理活性物質がある程度以上の活性を有している状態であるか否かを予め判別しておくことが必要になる。

したがって、上記の濃度測定動作を行なう前に、標準液をキャリブレーションすることにより得られた仮の濃度測定データを予め設定されている閾値と比較し、仮の濃度測定データが閾値よりも小さい場合には、測定対象物質の濃度測定を行なうことを未然に防止すべく、生理活性物質の活性が低下して正確な濃度測定を行なうことができない状態であることを表示するようにしている。

この結果、生理活性物質の活性がある程度以上である条件下においてのみ測定対象物質の濃度測定を行なうことができ、濃度測定精度を高く維持

記有機化合物、蛋白質等の測定を行なうための研究開発が行なわれている。

そして、上記バイオセンサを使用して対象物質の測定を行なう場合には、通常、対象物質の酸化、還元等を上記生理活性物質の存在下において行なわせ、生成物質、或は消失物質の量を測定することにより測定対象物質の濃度を測定するのであるから、生理活性物質が十分な活性を保持している状態でなければ、正確な濃度の測定を行なうことができなくなってしまう。

このような点を考慮して、従来は、予め濃度が分っている標準液を使用してキャリブレーションを行なうことにより、仮の濃度測定データを得、次いで、測定対象物質を使用して濃度測定動作を行なうことにより、濃度測定データを得、上記仮の濃度測定データと濃度測定データとの比に基いて測定対象物質の真の濃度データを得るようにしている。

したがって、生理活性物質の活性がある程度低下していても、測定対象物質の濃度を正確に測定

することができるようになる。

しかし、上記のようにして生理活性物質の活性低下を検出する場合には、保存状態に保持されていた酵素電極に対して標準液によるキャリブレーションを行なうことにより始めて生理活性物質の活性がある程度以上であるか否かを判別することができるるのであるから、下地電極に対して逆バイアス電圧を印加することによるリフレッシュ動作、キャリブレーション動作を行なった後でなければ、ある程度以上の活性を有している状態であるか否かを判別することができず、判別までに長時間がかかることがあるという問題がある。また、以上のようにして活性の程度の判別を行なった後に固定化酵素膜の交換動作を行なうことになるので、高精度の濃度測定を行なえる状態を出現させるまでの所要時間が著しく長くなってしまうという問題がある。特に、長期間にわたって測定動作を遂行しなかった場合においては、前回の濃度測定時における生理活性物質の活性と大巾に異なる活性状態になっている場合が多いのであるか

ら、上記の問題が顕著になってしまふ。

＜発明の目的＞

この発明は上記の問題点に鑑みてなされたものであり、乾燥に起因する固定化酵素膜の活性低下を簡単に検出することができるバイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置を提供することを目的としている。

＜問題点を解決するための手段＞

上記の目的を達成するための、この発明のバイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置は、非測定時における下地電極間の通電電流を検出する電流検出手段と、電流検出手段により検出された通電電流を所定の基準値と比較し、通電電流が基準値よりも小さい状態に対応させて活性低下状態検出信号を生成する処理手段とを具備するものである。

但し、上記電流検出手段としては、下地電極間に保存電圧を印加している状態における通電電流を検出するものであってもよく、或は、下地電極間にリフレッシュのための逆バイアス電圧を印加

また、非測定状態においても、下地電極の間に所定の直流電圧が印加されているのであるから、固定化酵素膜が十分な湿润状態に保持されていれば、下地電極間に、印加電圧、下地電極取付け部材の絶縁抵抗、および湿润液の導電率に基いて定まる所定の電流が流れ、逆に湿润状態が損なわれれば、電流値が小さくなってしまう。したがって、下地電極間の通電電流を電流検出手段により検出し、電流検出手段により検出された通電電流を処理手段において所定の基準値と比較し、通電電流が基準値よりも小さい状態に対応させて活性低下状態検出信号を生成することができる。

さらに詳細に説明すると、固定化酵素膜の活性低下は、生理活性物質の剥離、固定化酵素膜の乾燥等、種々の原因により発生するのであるが、最も発生する可能性が高い原因が乾燥であるから、上記のように固定化酵素膜の湿润度に対応する下地電極間の通電電流を検出し、通電電流を所定の基準値と比較して、通電電流の方が小さいことを識別することにより、固定化酵素膜の活性がある

している状態における通電電流を検出するものであってもよい。そして、後者の場合には、下地電極間にリフレッシュのための逆バイアス電圧を印加している状態における通電電流の最大値を検出するものであることが好ましい。

また、上記電流検出手段としては、下地電極間に保存電圧を印加している状態における通電電流、および下地電極間にリフレッシュのための逆バイアス電圧を印加している状態における通電電流の最大値を検出するものであってもよい。

＜作用＞

以上の構成のバイオセンサにおける固定化酵素膜活性低下状態検出装置であれば、測定対象物質が固定化活性膜に導かれることにより、所定の反応が行なわれて特定の物質が生成され、或は消失される。この結果、下地電極の間に電気信号が生成され、外部に導かれる。

したがって、外部に導かれた電気信号に対して所定の処理を施すことにより、測定対象物質に対応する濃度検出データを得ることができる。

程度の活性よりも低下したことを検出することができる。

したがって、実際に濃度測定を開始する前に固定化酵素膜の活性が低下したことを検出することができ、キャリブレーション、およびキャリブレーションに続くリフレッシュを行なうことなく、直ちに固定化酵素膜を交換すべきであることを検出し、交換を行なうまでの所要時間を著しく短縮することができる。

そして、上記電流検出手段が、下地電極間に保存電圧を印加している状態における通電電流を検出するものである場合には、バイオセンサを保存している期間中ずっと固定化酵素膜の活性が低下したか否かを判別し続けることができ、逆バイアスを印加した状態におけるリフレッシュ、およびキャリブレーションを行なうことなく、保存状態に起因する固定化酵素膜の活性劣化をも確実に検出することができる。

また、上記電流検出手段が、下地電極間にリフレッシュのための逆バイアス電圧を印加している

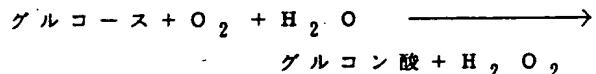
状態における通電電流を検出するものである場合には、リフレッシュ動作を行なわなければ固定化酵素膜の活性が低下しているか否かを判別することができず、判別までの所要時間がやや長くなるのであるが、キャリブレーションを行なうことなく固定化酵素膜の活性が低下しているか否かを判別することができるのであるから、判別までの所要時間の増加を著しく抑制することができる。この場合において、下地電極間にリフレッシュのための逆バイアス電圧を印加している状態における通電電流の最大値を検出するものである場合には、リフレッシュ電流の過渡値に基く不正確な判別を確実に排除して、正確に固定化酵素膜の活性が低下しているか否かを判別することができる。

さらに、上記電流検出手段が、下地電極間に保存電圧を印加している状態における通電電流、および下地電極間にリフレッシュのための逆バイアス電圧を印加している状態における通電電流の最大値を検出するものである場合には、バイオセンサを保存している状態のみならず、逆バイアス印

上記酵素電極本体(1)の他側所定位置には、上記作用電極(2)、および対向電極(3)に対してそれぞれ接続された信号取出し端子(61)(62)を設けている。

したがって、固定化GOD膜(4)において、

GOD



の酵素反応が行なわれ、生成されるH₂O₂の量に対応する電流が作用電極(2)と対向電極(3)との間に生成され、信号取出し端子(61)(62)を通して外部に取出されることになる。

第2図は第1図のバイオセンサに対するバイアス供給構成を示す電気回路図であり、電流-電圧変換用オペアンプ(9)の出力端子(9c)と反転入力端子(9a)との間に電流-電圧変換用抵抗(10)を接続しているとともに、反転入力端子(9a)と非反転入力端子(9b)との間に、アノードが反転入力端子側となるようにダイオード(11)を接続している。そして、上記反転入力端子(9a)を作用電極(2)と接続し、

加によるリフレッシュ状態においても、固定化酵素膜の活性が低下したか否かを判別することができる。

＜実施例＞

以下、実施例を示す添付図面によって詳細に説明する。

第1図はこの発明のバイオセンサの一実施例の構成を示す縦断面図であり、酵素電極本体(1)の一側を凸面としているとともに、凸面において外部に露呈する状態でPtからなる作用電極(2)、およびAgからなるリング状の対向電極(3)を設けている。そして、上記凸面を蔽う状態で、グルコースオキシダーゼ(以下、GODと略称する)を固定した固定化GOD膜(4)、およびセロハン等からなる拡散制限膜(5)(6)を設けている。そして、上記固定化GOD膜(4)、および拡散制限膜(5)はホルダーキャップ(7)により酵素電極本体(1)に対して一体的に装着され、上記拡散制限膜(6)は、ホルダーキャップ(8)により、上記ホルダーキャップ(7)を包囲する状態で酵素電極本体(1)に対して装着されている。尚、

対向電極(3)を抵抗(13)を介して逆バイアス供給端子(12)と接続しているとともに、ツェナーダイオード(14)を介してアース(15)と接続している。また、定電圧源(16)からの出力電圧を抵抗(17)(18)により分圧し、バッファアンプ(19)を通して上記非反転入力端子(9b)に供給している。さらに、上記出力端子(9c)を、切替スイッチ(22)を介して、活性状態判別用の比較回路(23)、および濃度測定データ生成用の演算部(24)と接続している。

上記の構成のバイオセンサの動作は次のとおりである。

グルコース濃度測定動作を行なわない場合には、逆バイアス供給端子(12)を通して0Vを供給するとともに、切替スイッチ(22)を切替操作することにより、出力端子(9c)を比較回路(23)と接続するだけでよく、以下のようにして下地電極の保存状態保持を行なわせることができるとともに、保存状態における固定化GOD膜の活性状態を判別することができる。

即ち、作用電極(2)と電流-電圧変換用オペアン

ブ(9)の反転入力端子(9a)との間が接続されるとともに、逆バイアス供給端子に0Vが供給されるので、作用電極(2)と対向電極(3)との間に、定電圧源(16)の出力電圧、およびツェナーダイオード(14)の端子間電圧に基いて定まる順バイアス(この実施例の場合には0.7V)が供給され続けることになる。

また、作用電極(2)と対向電極(3)との間に順バイアスが供給されている状態において、固定化GOD膜(4)が十分な湿润状態に保持されていれば、固定化GOD膜(4)に含浸されているバッファ液を通して数nAよりも大きい電流が流れ、逆に、固定化GOD膜(4)の湿润状態が低下すれば、バッファ液を通して流れる電流が減少する。そして、このように固定化GOD膜(4)の湿润状態に対応して変化する電流信号は、電流-電圧変換用オペアンプ(9)により電圧信号に変換された後、切替スイッチ(22)を通して比較回路(23)に供給されるので、比較回路(23)に予め供給されている基準電圧信号(例えば1nAの通電電流に対応する電圧信号)

ダイオード(11)の端子間電圧等を考慮すれば、2.1Vになる)。

したがって、この逆バイアス状態においては、作用電極(2)から対向電極(3)に向かって電流が流れ、作用電極(2)の表面に形成された酸化膜の還元が行なわれることにより、元の活性状態に復帰させられる。この場合において、電流の増加に伴なって電流-電圧変換用オペアンプ(9)の出力が飽和し、反転入力端子(9a)の電圧が非反転入力端子(9b)の電圧よりも大きくなると、ダイオード(11)が順バイアス状態になり、導通するので、リフレッシュ電流がダイオード(11)によりバイパスされた状態になり、所定の逆バイアスを与えた状態で作用電極(2)に十分な電流(例えば数nA程度)を流し、確実なリフレッシュを行なわせることができる。

以上のようにして電極のリフレッシュを行なった後は、切替スイッチ(22)を切替操作することにより電流-電圧変換用オペアンプ(9)の出力端子(9c)と比較回路(23)とを接続し、同時に逆バイアス供給端子(12)から0Vの電圧信号を供給して対

との比較が行なわれ、基準電圧信号の方が大きいか否かに対応して、活性低下状態であることを示す信号、或は十分な活性を保持している状態であることを示す信号を選択的に出力することができる。

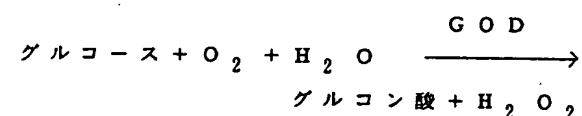
したがって、逆バイアス供給によるリフレッシュ動作、標準液に基くキャリプレーション動作を全く行なわせることなく、直ちに固定化GOD膜(4)の活性が十分であるか、低下しているかを判別することができ、固定化GOD膜(4)の活性が低下している場合には、直ちにホルダキャップ(7)(8)を取外すことにより、固定化GOD膜(4)を交換し、高精度のグルコース濃度測定を行なうことができる状態を確保することができる。

また、グルコース濃度の測定を行なう場合には、先ず、逆バイアス供給端子(12)に、抵抗(17)(18)による分圧電圧よりも高い所定の正電圧(この実施例の場合には、例えば5V)を供給することにより、ツェナーダイオード(14)を通して作用電極(2)を逆バイアス状態とする(逆バイアス電圧は、

対向電極(3)を接地状態にすることにより、作用電極(2)と対向電極(3)との間に0.7Vの順バイアス電圧を印加する)。

そして、この状態において測定対象溶液を酵素電極に滴下すればよく、以下のようにしてグルコース濃度に対応する信号を出力することができる。

上記滴下された測定対象溶液は、拡散制限膜(6)によりグルコースの透過がある程度制限された状態で固定化GOD膜(4)に導かれ、



で示される酵素反応が行なわれる結果、存在するグルコース濃度に対応する量のH₂O₂が生成される。そして、生成されたH₂O₂が、下地電極の表面に導かれ、しかも上記順バイアス電圧が印加されているので、作用電極(2)の表面において酸化反応が行なわれると同時に作用電極(2)を通してH₂O₂の量に対応する電流が outputされる。この電流は、電流-電圧変換用オペアンプ(9)の反転入

力端子(9a)に供給されるのであるから、出力端子(9c)から、上記電流に比例した電圧信号に順バイアスによるオフセット電圧が重畠された電圧信号を取出すことができる。

したがって、上記電圧信号を、切替スイッチ(22)を通して濃度測定データ生成用の演算部(24)に供給することにより、上記電流に比例する電圧信号のみを抽出し、一次微分を施して、一次微分値のピーク値を検出し、必要な処理を行なうことによりグルコース濃度信号を得ることができる。

以上要約すれば、固定化GOD膜(4)が十分な湿润状態、即ち、活性が十分な状態であれば、保存状態において、比較回路(23)から活性が十分であることを示す信号が出力されるので、そのまま逆バイアスリフレッシュを行なって電極を活性化させ、次いで順バイアスを供給することにより、測定対象物質の濃度を高精度に測定することができる。

逆に、固定化GOD膜(4)の湿润が不十分な状態であれば、作用電極(2)と対向電極(3)との間に流れ

μ Aよりも小さければ、活性が低下して、固定化GOD膜(4)を交換する必要があることを示す信号が比較回路(23)から出力されることになる。

さらに、保存状態、逆バイアスリフレッシュ状態、および測定状態に対応して切替えられる切替スイッチ(22)を使用するとともに、保存状態、逆バイアスリフレッシュ状態に対応する比較回路を使用することにより、保存状態、逆バイアスリフレッシュ状態の何れの状態においても固定化GOD膜(4)の活性低下を検出することができるようになることもできる。

尚、この発明は上記の実施例に限定されるものではなく、例えばグルコース濃度以外の対象物質の濃度、例えば、尿素濃度等の測定、 H_2O_2 以外の反応生成物質、或は反応消失物質の量に基く濃度の測定に適用することが可能である他、この発明の要旨を変更しない範囲内において種々の設計変更を施すことが可能である。

<発明の効果>

以上のようにこの発明は、非測定状態における

電流が小さくなるので、比較回路(23)から活性が不十分であることを示す信号が出力される。したがって、この場合には、直ちに固定化GOD膜(4)を交換して、活性が十分な状態とし、その後、上記と同様にして測定対象物質の濃度を高精度に測定することができる。

上記の実施例においては、保存状態と他の状態とに対応して切替えられる切替スイッチ(22)を使用しているとともに、比較回路(23)における基準電圧を、通電電流が 1 nA に対応する電圧に設定しているが、逆バイアスリフレッシュ状態と他の状態とに対応して切替えられる切替スイッチ(22)とし、しかも、比較回路における基準電圧を、通電電流が $1\text{ }\mu\text{A}$ に対応する電圧に設定することも可能であり、このように設定しておけば、逆バイアスリフレッシュ状態において固定化GOD膜(4)の湿润状態に対応するリフレッシュ電流が流れるので、リフレッシュ電流が $1\text{ }\mu\text{A}$ よりも大きければ、活性が十分であることを示す信号が比較回路(23)から出力され、逆に、リフレッシュ電流が $1\text{ }\mu\text{A}$

下地電極間の通電電流の減少に基いて固定化酵素膜の活性低下状態を検出することができるので、測定対象物質の濃度を測定するために必要とされている動作の少なくとも一部の遂行を行なうことなく活性低下状態を検出することができ、活性が低下した固定化酵素膜の交換を迅速に行なうことができるという特有の効果を奏する。

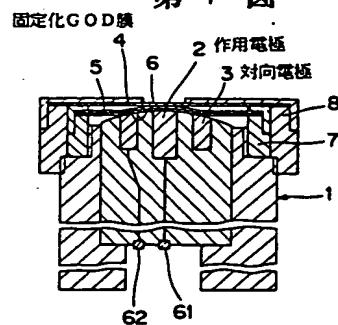
4. 図面の簡単な説明

第1図はこの発明のバイオセンサの一実施例の構成を示す縦断面図。

第2図は第1図のバイオセンサに対するバイアス供給構成を示す概略図。

- (2)…作用電極、(3)…対向電極、
- (4)…固定化GOD膜、
- (9)…電流-電圧変換用オペアンプ、
- (23)…比較回路

第 1 図



第 2 図

